

Ultrahistologische Untersuchungen
über die Reaktionen homologer
und heterologer Kulturzellen
auf aktives und inaktives Avipoxvirus

Gottlieb Scherrer

1981

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. H. Mahnel

**Ultrahistologische Untersuchungen über die
Reaktionen homologer und heterologer Kulturzellen auf
aktives und inaktives Avipoxvirus**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tierärztlichen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Gottlieb Scherrer

aus

Überlingen

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof: Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. H. Mahnel

Korreferent: Prof. Dr. E. Munz



Tag der Promotion: 24. Juli 1981

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

1.	VORWORT	1
2.	INHALT	2
3.1.	Einleitung	3
3.2.	Die Aufgaben der Literaturwissenschaft	4
3.3.	Die Methoden der Literaturwissenschaft	5
3.4.	Die Bedeutung der Literaturwissenschaft	6
3.5.	Die Aufgaben der Literaturwissenschaft	7
3.6.	Die Methoden der Literaturwissenschaft	8
3.7.	Die Bedeutung der Literaturwissenschaft	9
3.8.	Die Aufgaben der Literaturwissenschaft	10

3. KAPITEL: DIE LITERATUR

Meinen lieben Eltern gewidmet

3.1.	Einleitung	11
3.2.	Die Aufgaben der Literaturwissenschaft	12
3.3.	Die Methoden der Literaturwissenschaft	13
3.4.	Die Bedeutung der Literaturwissenschaft	14
3.5.	Die Aufgaben der Literaturwissenschaft	15
3.6.	Die Methoden der Literaturwissenschaft	16
3.7.	Die Bedeutung der Literaturwissenschaft	17
3.8.	Die Aufgaben der Literaturwissenschaft	18
3.9.	Die Methoden der Literaturwissenschaft	19
3.10.	Die Bedeutung der Literaturwissenschaft	20

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	
2.1.	Taxonomie des Hühnerpockenvirus	3
2.2.	Aufbau des Hühnerpockenvirus	4
2.3.	Morphologie der Vermehrung von Pockenviren in permissiven Zellsystemen	7
2.4.	Das Verhalten von Pockenviren in hetero- logen, bzw. nicht kompetenten Zellsystemen	14
2.5.	Reaktionen zwischen inaktivierten Pocken- viren und Kulturzellen	17
3.	MATERIAL UND METHODEN	
3.1.	Virusstamm	22
3.2.	Zellkulturtechnik	22
3.3.	Herstellung der Virusstammsuspension	24
3.4.	Suspension aus inaktiviertem Virus	25
3.5.	Virustitrierung	26
3.6.	Versuchsanordnung für die ultrahistolo- gische Untersuchung der Viruszellreaktionen	26
3.7.	Versuchsanordnung zur Erstellung der Ver- mehrungskurve des aktiven Virus in HEF- und ERN - Zellen	28
3.8.	Ultrahistologie	29

4.	VERSUCHE UND ERGEBNISSE	
4.1.	Vermehrung des attenuierten Hühnerpocken- virus (HP-441) in HEF-Zellkulturen	30
4.1.1.	Verlauf der Virusvermehrung	31
4.1.2.	Virologische - ultrahistologische Befunde	34
4.2.	Verhalten des HP-441-Virus in ERN-Zell- kulturen	38
4.2.1.	Biologische Kontrollversuche über den Infektionsverlauf	38
4.2.2.	Ultrahistologische Befunde	41
4.3.	Ultrahistologische Befunde zur Reaktion von Kulturzellen auf strahleninaktiviertes HP-441-Virus	46
5.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	51
6.	ZUSAMMENFASSUNG	56
7.	LITERATURVERZEICHNIS	58

1. Einleitung

Viren fungieren in der belebten Natur nicht nur als Erreger von Infektionen und Krankheiten. Als biologische Einheiten und Makromoleküle wirken sie sowohl in vermehrungsfähigem wie auch inaktiviertem Zustand sowohl spezifisch antigen, als auch induktiv auf die allgemeine Abwehr des Organismus. Von einer Reihe von Virusarten ist längst bekannt, daß sie sehr gute Induktoren der Interferonbildung sind. Aber auch viele andere unspezifische Abwehrmechanismen humoraler und zellulärer Art, zusammengefaßt unter dem Phänomen der Paramunität (Mayr et al., 1979), können durch bestimmte Viren in homologen wie auch heterologen Wirten stimuliert werden. Mayr hat in letzter Zeit nachgewiesen, daß ein von ihm attenuiertes Hühnerpockenvirus in aktiver wie auch inaktivierter Form bei Säugern signifikant paramunisierend wirkt (1979).

Auf welche Weise ein Pockenvirus in heterologen Wirten Reaktionen solcher Art bewirkt, ist weitgehend unbekannt. Eine enge Wechselwirkung zwischen Virion und Zelle darf jedoch vorausgesetzt werden. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Klärung dieser offenen Frage zu leisten.

Für Untersuchungen über die Wechselbeziehungen zwischen Virus und Zelle bieten sich die in ihren zellbiologischen Reaktionen gut erforschten Pockenviren allgemein und der

von Mayr entwickelte Avipox-Ausgangsstamm im besonderen an. Es sollte vergleichend und hauptsächlich durch ultra-histologische-elektronenoptische Methoden untersucht werden, welche Reaktionen zwischen vermehrungsfähigem sowie durch Gammastrahlen inaktiviertem Avipoxvirus gallinae und homologen permissiven sowie heterologen nicht permissiven Kulturzellen erkennbar sind.

2. Schrifttum

2.1. Taxonomie des Hühnerpockenvirus

Das Hühnerpockenvirus (*Avipoxvirus gallinae*) wird zur Familie der Poxviridae gezählt. Diese umfaßt die größten bekannten Viren. Pockenviren treten bei Säugern, Vögeln und Arthropoden auf. Während einige Spezies dieser Gruppe ein sehr enges Wirtsspektrum besitzen, ist dies bei anderen breitgefächert. Die Familie der Pockenviren wird in sechs Genera unterteilt. Das Hühnerpockenvirus gehört zum Genus *Avipoxvirus*. Dieser Untergruppe zuzuordnen sind ferner Puten-, Tauben-, Kanarien-, Wachtel-, Agaporniden- und andere Geflügelpockenviren. Zwischen diesen Spezies bestehen serologisch nur teilweise enge Beziehungen, eine antigene Verwandtschaft zu den Säugerpocken liegt nicht vor. Avipoxviren sind etwas größer, weniger quaderförmig und mehr abgerundet als andere Pockenpartikel. Bei ihrer Vermehrung in der Zelle bilden sie zytoplasmatische Einschlüsse, sogenannte Bollingersche Körperchen, welche sich im Unterschied zu Einschlüssen anderer Pockenviren besonders gut mit Fettfarbstoffen (Sudan III) anfärben lassen (Bollinger, 1873).

Pathogene Eigenschaften besitzen Avipoxviren nur für Vö-

gel. Über die Vermehrungsfähigkeit in anderen Systemen ist recht wenig bekannt. Mayr und Mahnel konnten 1970 aus einem erkrankten Rhinoceros Viren isolieren, die auf Grund ihrer serologischen und immunologischen Eigenschaften eindeutig dem Genus Avipoxvirus, Spezies gallinae, zuzuordnen waren (Mayr und Mahnel, 1970).

2.2. Aufbau des Hühnerpockenvirus

Das Hühnerpockenvirus ist ein komplex aufgebautes, behülltes DNS-Virus, etwa 390 nm lang und 240 nm breit (Herzberg und Kleinschmidt, 1959). Sein Gewicht liegt mit $2,04 \times 10^{-14}$ g etwas über dem des Vacciniavirus mit $5,34 \times 10^{-15}$ g (Smadel et al., 1939) und anderer Pockenviren. Es enthält pro Partikel $5,54 \times 10^{-15}$ g Lipide, $7,51 \times 10^{-15}$ g Protein und $4,03 \times 10^{-16}$ g DNS (Randall et al., 1964). Die Nukleinsäure besteht aus einem einzigen basengepaarten DNS-Molekül mit einem Molekulargewicht von 200×10^6 Dalton (Heyde und Peters, 1971). Mit einer Länge von 100 μ m (Heyde et al., 1967) dürfte es die längste virale Nukleinsäure darstellen.

Mit Sicherheit enthalten reife Avipoxviren wie die Orthopoxviren vier wichtige Enzyme, die speziell beim Vacciniavirus nachgewiesen wurden: Zwei Nukleasen mit unterschiedlichem pH-Optimum, eine Nukleotidphosphohydrolase und

eine DNS-abhängige RNS-Polymerase (Kates und McAuslan, 1967; Rolle und Mayr, 1978).

In ihrer Struktur sind alle Pockenviren fast gleich. Die Form ist quaderförmig bis oval. Das Virion besitzt einen deutlich hervortretenden hantelförmigen Innenkörper. In diesem auch als "Core" bezeichneten Kern des Partikels läßt sich bei spezieller Fixierung eine "blümchenartige" Struktur erkennen, vermutlich die DNS (Heyde und Peters, 1971). Umgeben wird sie von einem Proteinmantel. Er besteht aus zwei Schichten - einer inneren dünnen Lage und einer dickeren äußeren mit Projektionen von etwa 4,5 nm Durchmesser und 25 nm Länge (Heyde et al., 1964). DNS, Corematrix und Proteinmantel sind mit dem Nukleokapsid anderer Viren zu vergleichen. Das Core wird von einer elektronenoptisch helleren Zone umgeben, die außen von einer Doppelmembran umschlossen wird. In die Schicht zwischen Coremembran und äußerer Doppelmembran sind lateral auf den Flachseiten im Bereich der konkaven Einbuchtungen des Innenkörpers zwei wulstige Gebilde, die sogenannten Lateralkörper, eingelagert. Nach Medzon und Bauer (1970) sollen sie eine fadenartige Struktur in longitudinaler Richtung aufweisen. Die äußere Hülle besteht aus einer dreischichtigen Membran mit einem Durchmesser von ungefähr 22,5 nm. Chemisch setzt sie sich aus Phospholipiden zusammen und ähnelt damit sehr der

sogenannten "Einheitsmembran" (Dales und Mosbach, 1968). An ihrer Oberfläche trägt sie "tubuläre" Filamente. Manche Autoren deuten diese als Doppelhelix, gebildet aus zwei Proteinfäden. Bei Kontrastierung mit Uranylacetat und Platin erhält man einen höckrigen Eindruck von ihnen (Westwood et al., 1964; Heyde et al., 1964 und 1965). Genauer beschrieben werden diese Oberflächenstrukturen von Medzon und Bauer (1970) für das Vacciniavirus. Nach ihren Untersuchungen bestehen sie aus zwei parallelen Wülsten kleiner kugelförmiger Einheiten, die die sonst glatte Oberfläche um etwa 15 nm überragen. Der Durchmesser eines solchen kugeligen Gebildes beträgt nach ihren Angaben etwa 5 nm, ihr Abstand zueinander 6,5 - 7 nm. Die gesamte Breite des Doppelwulstes beläuft sich auf etwa 15 nm. Ihre Länge ist unterschiedlich.

An Hand dieser Oberflächenstrukturen läßt sich morphologisch eine klare Differenzierung zwischen bestimmten Pockenviren durchführen. Die Filamente sind überwiegend unregelmäßig, nur bei Parapocken spiralig regelmäßig angeordnet. Den Entomopoxviren verleiht ihre Oberflächenstruktur ein mehr maulbeerartiges Aussehen (Rolle und Mayr, 1978).

2.3. Morphologie der Vermehrung von Pockenviren in permissiven Zellsystemen

Die Vermehrung der Pockenviren läßt sich bei allen bisher untersuchten Modellen nach dem für Viren allgemein gültigen Schema einteilen (siehe Tabelle 1).

Nach der Adsorption an der Zellmembran erfolgt die Aufnahme des Virus durch einen der Phagozytose (Zytose, Endozytose, Pinozytose, Viropexis) ähnlichen Vorgang (Dales, 1963; Dales und Käjioka, 1964). Das Partikel wird von der Zellmembran umflossen und erscheint dann innerhalb der Zelle in einer Vakuole. Durch mehr oder weniger gleichzeitige Lysis der umschließenden zellulären Vakuolenmembran und der äußeren Virushülle gelangt das Core des Virion ins Zytoplasma. Diese Lysisvorgänge sollen auch direkt unter Umgehung des Stadiums der Vakuolenbildung gleich im Anschluß an das Adsorptionsstadium einsetzen können (Dales, 1976). Die Freisetzung der DNS aus dem gegenüber zellulären DNS-Nukleasen resistenten Nukleokapsid, das nun frei innerhalb der Zelle liegt, erfolgt durch ein viruseigenes Enzym (Dales und Käjioka, 1964; Holowczak, 1972). Bemerkenswert erscheint, daß die m-RNS-Produktion schon vor der Freisetzung der DNS anläuft, ebenfalls gesteuert von einer viruseigenen RNS-Polymerase (Holowczak, 1972; Metz et al., 1975). Es wird daher bei der Virusver-

mehrung und Reifung auch zwischen "früher" und "später" DNS unterschieden, welche erst nach der DNS-Replikation entsteht. Schon wenige Stunden nach Aktivierung der viralen DNS treten im Zytoplasma infizierter Zellen elektronenoptisch dunklere Zonen mit fibrillärer Grundstruktur auf. Anfangs können in ihrer Nähe noch leere Core-Hüllen beobachtet werden (Dales, 1963). In diesen Viroplasmazonen erscheinen dann die ersten noch unreifen Viruspartikel. Zunächst sind nur sphärische Membranbruchstücke zu erkennen. Sie weisen einen trilaminären Bau auf und entsprechen hinsichtlich der Breite der bekannten Einheitsmembran. Eine Verbindung zu zelleigenen Membransystemen konnte bisher nicht festgestellt werden (Dales und Mosbach, 1968; Ichihashi et al., 1971). Nach außen hin tragen diese Teile der späteren Virushülle feine "Spikes", die ihr anscheinend von Anfang an eine bestimmte Krümmung und Steifheit verleihen. Bei Hemmung der Virusvermehrung durch Rifampicin fehlen diese Spitzen, und es kommt zu Verformungen der neugebildeten Hüllbruchstücke (Ichihashi et al., 1971).

Bei normaler Entwicklung nehmen die Virusmembranen allmählich eine ovoide geschlossene Form an. Ihr Inhalt erscheint bei manchen gleichmäßig hell, fast ohne Struktur, andere zeigen einen kristalloid aufgebauten, exzentrisch gelegenen Kern (Morgan, 1976 b).

Nach Morgan (1976 a u. b) kommt es erst dann zur in sich

geschlossenen Virushülle, wenn sich diese Kerne von außen ins Innere der Kugeln verlagert haben. Ihrem elektronen-optischen Verhalten nach sind diese Gebilde wohl als Nukleinsäure anzusprechen.

Während des folgenden Reifungsprozesses bemerkt man zuerst eine Streckung und Parallelisierung der NS-Filamente. Sie wandern mehr zur Mitte der Virusvorstufen, und über verschiedene Zwischenschritte entsteht schließlich eine bikonkave Scheibe, die dem Core des reifen Virus entspricht (Morgan, 1976 a+b). Auch die äußere Hülle unterliegt Veränderungen. Die Spikes verschwinden und an ihre Stelle treten die in 2.2. ausführlich beschriebenen Strukturen. Inwieweit spät gebildete Protein- und Lipidkomponenten nachträglich während der Reifung in das Virus mit eingebaut werden, ist noch weitgehend unbekannt (Morgan, 1976b).

Reife Pockenviren können auf zwei Wegen aus der Zelle gelangen:

- a.) Die Zelle wird zerstört und Virusteilchen werden frei.
 - b.) Die Viruspartikel werden kontinuierlich ausgeschleust.
- Bei diesem Vorgang konnten für verschiedene Virusstämme unterschiedliche Mechanismen beobachtet werden (Ichihashi et al., 1971; Morgan, 1976 b; Stokes, 1976):

Nach Ichihashi et al. (1971) verlassen die reifen Elementarkörperchen ihre Bildungsstätten und sammeln sich zunächst

in der Umgebung des Zentriols, wo sie in Beziehung zum Golgiapparat treten. Dort werden die Partikel von diesem Membransystem umhüllt beziehungsweise umwickelt. Die einen sind demnach von einer Membran, die anderen von zwei umgeben. Im Anschluß daran gelangen sie in einer Art umgekehrten Phagozytose (Exozytose) nach außen. Von Stokes (1976) wurden membranähnliche Strukturen beobachtet, welche die Viren umhüllen und in die Mikrovilli ziehen. Dort erfolgt an ihrer Spitze die Freisetzung direkt in den interzellulären Raum.

Aus Untersuchungen von Stern und Dales (1974) mit radioaktiv markierten Substanzen geht hervor, daß ein "budding" wie bei anderen Virusarten bei den Pockenviren als Ausschleusungsmechanismus nicht in Betracht kommt.

Mit zunehmender Virusvermehrung gerät der Wirtsstoffwechsel immer mehr aus dem Gleichgewicht. Im Endstadium sistiert sogar die Virusvermehrung. Der kompakte Zusammenhalt der Virusmatrix löst sich allmählich auf: Im Zytoplasma diffus verteilt findet man reife und unreife Viruspartikel und Hüllbruchstücke, die zuvor nur in den Produktionsstätten der Viren anzutreffen waren (Morgan, 1976 b).

Diese "Virusfabriken" wurden schon früh lichtmikroskopisch als zytoplasmatisch Einschlüsse erkannt. Nach ihren Entdeckern wurden sie bei den Hühnerpocken als Bollinger-sche Körperchen beziehungsweise Downie- oder Marchal-

Körper bei Vaccinia und anderen benannt. Es handelt sich dabei um Einschlüsse vom Typ A, die im Falle des Hühnerpockenvirus große Mengen von unreifen Viruspartikeln enthalten. Es wurden aber bei Geflügelpocken auch Einschlüsse vom Typ B, bestehend aus lockerem, filamentösem Material, beschrieben (Thiele et al., 1979). Obwohl sie rein zytoplasmatisch nachweisbar sind, besteht kein Zweifel, daß auch der Zellkern im Rahmen der Virusvermehrung zumindest beeinflußt wird. Inwieweit es sich hierbei um eine echte Beteiligung an der Produktion von infektiösem Material handelt, ist weitgehend ungeklärt (Jefferts und Holowaczak, 1971). Gafford und Randall (1976) stellten mittels radioaktiv markierter DNS und RNS fest, daß sich mehr virus-spezifische Nukleinsäure im Kern als im Plasma befindet. Die wirtseigene DNS-Synthese wird durch die Infektion blockiert (Joklik, 1966; Gafford et al., 1969; Gafford und Randall, 1976; Uh-Ho Kim et al., 1977; Pospischil und Bachmann, 1980).

In infizierten, für Avipoxviren voll empfänglichen Zellkulturen, wie solchen aus Hühnerembryofibroblasten, treten als Folge der Virusvermehrung spezifische zytopathische Veränderungen auf. Diese wurden von Mayr und Kalcher (1960 und 1961) für das virulente Hühnerpockenvirus genauer beschrieben:

Zunächst wird eine Abkuglung der Zellen beobachtet.

Ihre Fortsätze verschwinden. Der Zellverband, der sonst durch die enge Verflechtung der Zellen dicht geschlossen war, lockert sich. Die Zellen erscheinen als scharf konturierte, kugelige Gebilde mit granulomatösem Inhalt. Bei niedriger Impfdosis entstehen solche Abkugelungsareale nur vereinzelt, und die weitere Ausbreitung der Infektion kann, von diesen Herden ausgehend, in allen Richtungen beobachtet werden. Demzufolge kann man am Rande solcher "Plaques" noch relativ unveränderte Zellen finden. Ihnen folgt zur Mitte des Infektionsherdes hin eine Zone aus abgekugelten, mehr oder weniger stark degenerierten Zellen, wobei, je nach ursprünglicher Dichte der Kultur, verschieden große Lücken zwischen ihnen entstehen. Im Zentrum der Herde selbst treten schon bald p. inf. lytische Prozesse auf, die weiter um sich greifen und im Endstadium zur Zerstörung der ganzen Kultur führen können. Der zeitliche Ablauf dieser Vermehrungsvorgänge ist stark abhängig von dem Zustand der beimpften Zellkultur. Die in Tabelle 1 aufgeführten Werte sollen hierfür ungefähre Richtzahlen darstellen.

Der zytopathische Effekt, hervorgerufen durch das attenuierte Hühnerpockenvirus, unterscheidet sich von dem des virulenten, nicht abgeschwächten Stammes kaum. Die einzelnen Phasen des Effektes laufen lediglich schneller ab (Mayr und Malicki, 1965).

Phase	Hühner- pocken	Vaccinia
Adsorption	15 min	15 min
Penetration	2 Std.	1 Std.
Eklipse	12 - 24 Std.	6 - 10 Std.
exponentielle Virusvermehrung	36 - 72 Std.	12 - 24 Std.
höchster Virusgehalt	72 - 96 Std.	24 - 36 Std.
Beginn des mikro- skopisch erkenn- baren zytopa- thischen Effektes	etwa nach 48 Std.	etwa nach 16 Std.
vollständige Lysis der Zellkultur	etwa nach 96 Std.	etwa nach 30 Std.

Tabelle 1: Zeitliche Darstellung des Vermehrungszyklus
von Vaccinia- und Hühnerpockenvirus in voll-
empfindlichen Zellkulturen.

2.4. Das Verhalten von Pockenviren in heterologen beziehungsweise nicht kompetenten Zellsystemen

Über das Verhalten von Pockenviren in nicht kompetenten Wirten beziehungsweise wenig oder nicht permissiven Zellsystemen ist kaum etwas bekannt. Von Mayr und Mahnel (1970) wird über die Isolierung eines Hühnerpockenvirus aus einem erkrankten Rhinoceros berichtet. Das Tier hatte eine schwere Mykose und stand unter tierärztlicher Behandlung. Die Befunde weisen darauf hin, daß unter bestimmten Bedingungen (Immunsuppression) eine Haftung und Vermehrung von Geflügelpockenviren im Säuger nicht ausgeschlossen werden kann. In der gleichen Veröffentlichung wird auch eine Infektion mit Hühnerpockenviren bei einem Pferd zitiert.

Soekawa et al. (1977) berichten über eine experimentelle Infektion von Schweinen mit Pockenviren (Kuh- und Affenpockenvirus). Eine Virusvermehrung wurde nicht festgestellt. Histopathologisch wurden nukleäre und plasmatische Einschlüsse in den als Proben entnommenen Hautzellen nachgewiesen. Elektronenoptisch ließen sich folgende Abweichungen zur normalen Virusvermehrung feststellen:

- 1.) Abnahme der Zahl der Organellen, Vesikelbildung, Änderung der Chromatinverhältnisse im Kern.
- 2.) Der Aufbau der Viroplasmazonen war verändert: Sie

erschieden nicht mehr so kompakt - ihr Aufbau war lockerer. Die normalerweise granuliert Struktur wurde teilweise durch eine feine filamentöse ersetzt.

3.) Es traten abnorm entwickelte Virusmembranen auf, die die Matrix umgaben oder ihr benachbart waren.

4.) Man konnte kugelförmige Körper (Virusvorstufen) beobachten mit einem Durchmesser zwischen 400 und 450 nm, die offensichtlich kein Viroplasma enthielten, dafür aber manchmal Ribosomen oder andere Strukturen.

5.) Virusmembranen wurden auch im Zellkern beobachtet.

6.) In den Zellkernen traten Einschlüsse,teils aus fein granuliertem,teils aus fein filamentösem Material auf.

Mit Pockenviren in heterologen Zellkulturen befaßt sich eine Studie von Mahnel (1965). Er arbeitete mit Schweinenieren (ENS)-, Kälbernieren (ENK)-, und HeLa-Zellkulturen. Zur Infektion verwendete er unter anderem den virulenten Hühnerpockenstamm HP-1. Nach zwei bis drei Tagen p. inf. trat ein "zytotoxischer Effekt" auf bei einem Infektionsverhältnis von 1 : 1 oder größer. Eine Induktion dieses Effektes mit weniger Viren pro Zelle oder eine Fortzüchtung des Virus in Passagen war nicht möglich. Die Zelldegeneration zeigte sich in einer Abkugelung der Zellen, in der Bildung von scholligen Zellgruppen und von Lysis. Bei Nierenzellen war der Effekt nicht so typisch und die Zonen, in denen er auftrat, nicht so markant wie bei HeLa-Zellen.

Mahnel untersuchte auch die Wirkung von Vaccinia- und Hühnerpockenvirus, das mit ultravioletten Strahlen inaktiviert worden war, auf Zellkulturen verschiedenen Ursprungs. Während bei der Infektion von embryonalen Hühnerfibroblasten deutliche Zellveränderungen festzustellen waren, traten diese bei HeLa- und ENS-Kulturen nicht in Erscheinung. Aus diesen Untersuchungsergebnissen muß die Existenz einer gewissen Wechselwirkung zwischen inaktiviertem Virus und der Zelle mit Sicherheit angenommen werden. Je nach verwendetem System ist das Ausmaß dieser gegenseitigen Beeinflussung anscheinend recht unterschiedlich und kann in bestimmten Fällen bis zur vollständigen Degeneration und Lysis der Zelle führen.

Daß heterologe Zellen vermehrungsfähiges Hühnerpockenvirus aufnehmen und anschließend zumindest Virus-Antigen synthetisieren, haben Schestoschenko und Karev (1973) mittels Immunofluoreszenz nachweisen können. Mit zwei verschiedenen virulenten Hühnerpockenstämmen infizierte Zellkulturen (aus Knochenmark von Meerschweinchen sowie weißen Mäusen und aus Kaninchenlymphozyten) ließen 5 bis 24 Stunden später markante Fluoreszenz in Form "leuchtender Zytoplasmakörnchen" und auch verschiedentlich eine ausgeprägte Kernfluoreszenz vor allem bei kleinen Lymphozyten erkennen. Am besten ausgeprägt war die Zytoplasm fluoreszenz meist bei Myelozyten, Promyelozyten und Leukozyten.

McClain und Greenland (1964) infizierten permissive und nicht permissive Zellkulturen mit zwei unterschiedlichen Kaninchenpockenstämmen (RPu1 und RPu6/2). RPu6/2 vermehrte sich in den untersuchten Zellsystemen im Gegensatz zu RPu1 nur gering. Bei einer Mischinfektion mit beiden Stämmen konnte eine Vermehrung des Stammes RPu6/2 festgestellt werden, die die normalen Werte bei Einzelinfektion um mehr als das 100-fache überstieg, auch nach vorheriger Hitzeinaktivierung.

2.5. Reaktion zwischen inaktivierten Pockenviren und Kulturzellen

Als inaktiv wird ein Virus bezeichnet, wenn es seine Vermehrungsfähigkeit und damit seine Infektiosität und Pathogenität verloren hat. Die Inaktivität kann durch Veränderung an der Virusoberfläche, wodurch die Adsorption an und die Penetration in die Zellen nicht mehr möglich ist, durch Denaturierung des Virusproteins oder durch Schäden an der Virusnukleinsäure bedingt sein (Rolle und Mayr, 1978).

Inaktive Viren können vereinzelt als Fehlentwicklung beim Vermehrungsprozeß entstehen (Sharp, 1963), aber auch künstlich durch chemische und physikalische Methoden erzeugt werden. Chemische Substanzen wie Formaldehyd, Betapropiolakton und andere inaktivieren die Viren, wie auch Hitze, ultraviolette und ionisierende Strahlen. Bedingt durch die Natur

dieser Inaktivierungsmittel sind ihre Angriffspunkte am Virus und die Wirkungsmechanismen unterschiedlich. Es steht außer Zweifel, daß dosisabhängig neben der Vermehrungsfähigkeit auch andere Funktionen des Virus durch diese Faktoren tangiert und mehr oder weniger geschädigt werden (Decker et al., 1969; Benyesh et al., 1958).

Eine verhältnismäßig "schonende" Methode stellt die Inaktivierung von Viren mit ionisierenden Strahlen, speziell Gammastrahlen, dar. Letztere wie auch ultraviolette Strahlen sind elektromagnetische Wellen mit bestimmter Energie. In biologischen Systemen können Gammastrahlen durch Energieabgabe unvorhergesehene chemische Reaktionen auslösen. Man unterscheidet hierbei eine direkte von einer indirekten Wirkung. Erstere beruht darauf, daß genau die strahlenempfindliche Struktur getroffen wird, letztere in der Bildung von Ionen und freien Radikalen in ihrer Nachbarschaft (Stettmund von Brodorotti, 1978). Wo und wie ein Viruspartikel speziell geschädigt wird, ist weitgehend unbekannt und sicher entscheidend von dessen Aufbau und der Strahlendosis abhängig. Im allgemeinen wird angenommen, daß die Nukleinsäure den empfindlichsten Teil des Virions darstellt. Für das Poliovirus wurde aber ein strahlenempfindliches Volumen berechnet, das größer ist als das der RNS (Benyesh et al., 1958).

Dies zeigt, daß durchaus noch andere Strukturen außer der Nukleinsäure geschädigt werden können.

Die Kinetik der Inaktivierung von attenuiertem Hühnerpockenvirus durch Gammastrahlen verläuft nach Stettmund von Brodorotti als Reaktion 1. Ordnung (1978). Bei einer Strahlendosis von 1400 krad bleibt die paramunisierende Potenz erhalten (Mayr, noch nicht veröffentlichte Versuchsergebnisse).

Das Verhalten von inaktivierten Viren gegenüber Kulturzellen variiert offensichtlich je nach Art und Grad der Denaturierung, wie sie durch das Inaktivierungsmittel am Virus hervorgerufen wird. Entscheidend ist, ob das Virus überhaupt noch inkorporiert wird und wenn ja, inwieweit eine gewisse abortive Reaktion trotz der Inaktivierung in der Zelle noch ablaufen kann. Zu dieser Frage liegen allgemein und auch bei Pockenviren speziell nur wenige Studien vor.

Anfang der 60-er Jahre wurden unter anderer Fragestellung eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, die sich mit dem Phänomen der "Reaktivierung." befaßten (Fenner et al., 1959; Fenner und Woodroof, 1960; Abel, 1962; Joklik, 1962; Galasso und Sharp, 1963 a+b). Es handelt sich dabei um die Eigenschaft vermehrungsfähiger Pockenviren, inaktivierte Pockenpartikel auch heterologer Spezies bei

paralleler oder kurz aufeinanderfolgender Infektion kompetenter Zellen reaktivieren zu können. Eine Reaktivierung außerhalb der Zelle ist nicht möglich. Dieser Vorgang muß innerhalb der Zelle ablaufen. Indirekt zeigt dies, daß inaktivierte, aber noch reaktivierbare Viruspartikel von der Zelle "verarbeitet" werden.

Joklik (1964) untersuchte den Abbau von inaktiviertem Kainchenpockenvirus zur nackten DNS innerhalb von HeLa-Zellen. Als Inaktivierungsmittel verwendete er unter anderem ultraviolette Strahlen, Hitze, Harnstoff und Di-(β -chloräthyl)-methylamin ($\text{NCH}_3(\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl})_2$). Er stellte fest, daß der Abbau bis zu den Cores bei allen geschädigten Viren weitgehend normal verlief, der folgende "Uncoating-Prozeß" aber recht unterschiedlich beeinflussbar war. Nackte DNS in nennenswerten Mengen entstand nur bei der Inaktivierung mit Di-(β -chloräthyl)-methylamin. Während nach ultravioletter Bestrahlung eine geringe Freisetzung von DNS zu beobachten war, blieb diese nach Behandlung mit Harnstoff oder Hitze ganz aus. Ob diese freigesetzte DNS noch reproduziert, transkribiert und die entstehende m-RNS in Proteinstrukturen "übersetzt" werden kann, ist weitgehend unbekannt.

Dales (1973) gelang es ultraviolett bestrahltes inaktiviertes Vacciniavirus direkt elektronenmikroskopisch innerhalb von Zellen zu beobachten.

Kajioka et al. (1964) untersuchten ultrahistologisch und mit radioaktiv markierten Substanzen die Wirkung ultravioletter Strahlung und verschiedener chemischer Substanzen auf die virale DNS-Synthese und die Vermehrung des Vacciniavirus in L-Zellen. Sie kamen im wesentlichen zu denselben Ergebnissen wie Joklik (1964). Im besonderen konnten sie ultrahistologisch feststellen, daß der Abbau zur "nackten" DNS erheblich verlangsamt ablief und eine virale DNS-Synthese nicht erfolgte.

Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von Decker et al. (1969). Nach ihnen ist eine Replikation der DNS von γ -bestrahltem Vacciniavirus noch möglich, da dieser Mechanismus weniger strahlenempfindlich reagiert als die eigentliche Infektiosität.

3. Material und Methoden

3.1. Virusstamm

Alle Untersuchungen wurden mit dem Hühnerpockenvirus (Avipoxvirus gallinae) Stamm HP-1 durchgeführt. Dabei wurde ausschließlich ein weitgehend attenuiertes Kulturvirus der 441. bis 443. Passage (HP-441-Virus) aus embryonalen Hühnerfibroblasten verwendet (Mayr et al., 1966 und 1971).

3.2. Zellkulturtechnik

Kulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten (HEF)

Die Herstellung der Kulturen erfolgte nach der Methode von Mayr und Kalcher (1960).

Zehn Tage alte Hühnerembryonen wurden steril aus dem Ei entnommen und Kopf, Eingeweide und Lunge entfernt. Dann wurden sie zerkleinert und mehrmals mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Die Gewebestücke wurden in einem speziellen Gefäß (Trypsinierkolben) mit 0,25 %-iger gepufferter Trypsinlösung versetzt und auf

einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Durch ein sechsfaches Mullfilter wurde die Zell-Trypsin-Suspension mehrmals in Abständen von 15 bis 20 min abgegossen und dem Gewebe anschließend frische Trypsinlösung zugesetzt. Aus der gesammelten Zell-Trypsin-Suspension setzten sich nach fünfminütiger Zentrifugation (600 g) die Zellen als Sediment ab. Nach erneutem Suspendieren in 20 ml Medium erfolgte die Zählung der mit Trypanblau gefärbten Zellen in einer Kammer nach Fuchs-Rosenthal. Zur Aussaat in die Kulturgefäße wurde die Zellsuspension mit Anzuchtmedium auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen pro Milliliter eingestellt. Nach etwa 24 bis 48 Stunden wuchs in den Kulturgefäßen ein fast lückenloser Zellrasen aus. Das Anzuchtmedium wurde jetzt durch die gleiche Menge Erhaltungsmedium ersetzt.

Zusammensetzung des Anzuchtmediums:

- 78 % Earle'sche Salzlösung
- 10 % fötales Rinderserum
- 10 % hydrolysiertes Laktalbumin (in 5 %-iger Lösung)
- 1,5 % Phenolrot
- 100 I.E. Penicillin pro ml
- 100 μ Streptomycin pro ml

Zusammensetzung des Erhaltungsmediums:

- 98 % Rinderamnionflüssigkeit
- 1.5 % Phenolrot

Antibiotikazusatz wie beim Anzuchtmedium

Kulturen aus embryonalen Rindernieren (ERN)

Die Nieren wurden 6 bis 8 Monate alten Rinderföten steril entnommen, Kapsel und Mark entfernt und das Nierenparenchym fein zerkleinert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Gewebestückchen nach der üblichen Methode der wiederholten Trypsinandauung (wie oben beschrieben) behandelt. Bei einer Einsaat von etwa 5×10^5 Zellen pro ml dauerte es ungefähr sieben Tage, bis in den Kulturgefäßen ein lückenloser Zellrasen ausgewachsen war. Ein ein- bis zweimaliger Mediumwechsel wurde während dieser Zeit erforderlich. Danach erfolgte der Austausch des Anzuchtmediums, zusammengesetzt wie bei HEF-Kulturen, gegen ein gleiches, jedoch serumfreies Erhaltungsmedium.

3.3. Herstellung der Virusstammsuspension

Die Vermehrung des Virusstammes HP-441 erfolgte in primären HEF-Kulturen. In Rouxschalen angelegte, dichtgewachsenen Zellkulturen wurden mit je 2 ml Virussuspension (10^7 KID₅₀/ml) direkt ins Erhaltungsmedium beimpft und nach 30 Stunden zwei Drittel des Mediums abgezogen. Die Virusernte erfolgte 72 bis 96 Stunden p. inf. im Stadium der weit fortgeschrittenen Zelllysis durch Gefriertauen der Kulturgefäße bei -20 °C mit anschließender Ultraschall-

behandlung der Gesamtfraktion (30 sec bei 50 Watt mit einem Branson Sonifier B-12). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation aus der Suspension entfernt (10 min bei 600 g und 4 °C). Die Hälfte dieser zellfreien Virus-suspension wurde direkt bei -70 °C eingefroren, der Rest durch eine Gammabestrahlung inaktiviert (vgl. 3.4.) und dann ebenfalls bei -70 °C gelagert. Angaben über den Virusgehalt der inaktivierten Virusstammsuspension beziehen sich auf den Virusgehalt vor der Bestrahlung.

3.4. Suspension aus inaktiviertem Virus

Die Inaktivierung der HP-441-Stammsuspension wurde mittels ^{60}Co - Bestrahlung vorgenommen. Als Strahlenquelle diente eine ^{60}Co -Zelle (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada, LTD) im Institut für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Neuherberg mit der momentanen Dosisleistung von 17 krad pro Minute.

Die Inaktivierungsdosis betrug 1400 krad (Stettmund von Brodorotti, 1978).

3.5. Virustitrierung

Zur Ermittlung des Virusgehalts von Proben wurden Verdünnungsreihen nach Faktor 10 angelegt und je 0,1 ml der einzelnen Verdünnungsstufen auf jeweils vier Zellkultur-röhrchen verimpft. Als Nachweissystem dienten HEF-Röhrchenkulturen. Ausgewertet wurde anhand des zytopathischen Effektes zwischen dem 4. und 8. Tag p. inf. Die Angabe der Virustiter erfolgt in KID_{50} /ml. Die Berechnung wurde nach Kaerber und Spearman (1931) vorgenommen.

3.6. Versuchsanordnung für die ultrahistologische Untersuchung der Virus-Zell-Reaktion

Als Kulturgefäße wurden Vierkantflaschen nach Breed-Demeter verwendet. Von dichtgewachsenen Kulturen wurde das Anzucht-medium entfernt und der Zellrasen mit jeweils 2,5 ml aktiver beziehungsweise inaktivierter Virusstammsuspension (Virusgehalt rund $10^{7,5}$ KID_{50} / ml) überschichtet. Bei einer grob berechneten Zahl von etwa 5×10^6 Zellen pro Vierkantflasche entspricht dies einem Infektionsverhältnis von etwa 5 - 10 KID_{50} pro Zelle. Kulturen wurden dann 2 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert (Adsorptionsphase) und das Animpfvirus entfernt. Anschließend wurde ihnen jeweils

10 ml Erhaltungsmedium zugesetzt und bei 37 °C weiter bebrütet. In verschiedenen Zeitabständen erfolgte die Entnahme von Proben. Nach dem Abgießen des Mediums wurden die mittels eines Gummischabers von der Glaswand gelösten Zellen in etwa 5 ml PBS aufgenommen. Nach der Zentrifugation in Spitzgläsern bildeten die Zellen ein mehr oder weniger stabiles Pellet, das zunächst mit 1,5 %-igem Glutaraldehyd eine Stunde bei 4 °C fixiert wurde. Zur vollständigen Entfernung des Aldehyds diente ein einstündiges Waschen der Proben mit Soerensenphosphatpuffer, dem sich ein fünfstündiges Nachfixieren mit gepuffertem 2 %-igem Osmiumtetroxid anschloß. Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 15 Minuten entwässert und zur Vorbereitung auf den letzten Schritt des Einbettungsverfahrens mit Propylenoxid und einem Gemisch aus Propylenoxid und Durcupan (Fa. Fluka) über Nacht durchtränkt. Die Pellets wurden schließlich in kleinere Stückchen geteilt und endgültig in Durcupan eingebettet. Im Wärmeschrank bei 55 °C konnte der Kunststoff anschließend 2 bis 3 Tage durchpolymerisieren.

Folgende vier Versuchsserien wurden angefertigt:

- a) HEF-Zellen mit aktivem Virus
- b) ERN-Zellen mit aktivem Virus
- c) HEF-Zellen mit inaktivem Virus
- d) ERN-Zellen mit inaktivem Virus.

3.7. Versuchsanordnung zur Erstellung der Vermehrungs- kurve des aktiven Virus in HEF- und ERN-Zellen

Die Versuchsanordnung war für HEF- und ERN-Kulturen dieselbe. Als Kulturgefäße dienten jeweils fünf Vierkantflaschen. Sobald die primären Kulturen dichtgewachsen waren, wurde das Anzuchtmedium durch 9 ml Erhaltungsmedium ersetzt und die Flaschen mit je 1 ml Virussuspension beimpft. Nach zwei Stunden Adsorption bei 37 °C erfolgte ein Mediumwechsel bei allen fünf Flaschen, zwischen dem die Zellkulturen dreimal intensiv mit jeweils 15 ml PBS gewaschen wurden, um möglichst alles nicht adsorbierte Virus zu entfernen.

Proben des Kulturmediums wurden entnommen sofort nach der Beimpfung, vor und nach dem Mediumwechsel und des weiteren nach 6, 24, 48 und 96 Stunden p. inf. Zur Untersuchung der Zellphase auf ihren Virusgehalt wurden nach 2, 6, 24, 48 und 96 Stunden p. inf. jeweils eine Vierkantflasche nach Entfernung des Mediums und gründlichem Waschen mit PBS geerntet. Mittels eines Gummischabers wurden die Zellen von der Gaswand gelöst und in 5 ml PBS aufgenommen. Vor der Titrierung wurde die Zellphase durch eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (30 sec, 50 W).

3.8. Ultrahistologie

Die vollständig polymerisierten Präparatblöcke wurden nach entsprechender Vorbereitung (Trimmen) an einem Ultramikrotom (LKB-Ultratom II) mit einem Diamantmesser geschnitten (Schnittdicke ungefähr 20 - 30 nm). Als Träger der Schnitte dienten Formvar-befilmte Kupfernetze, die zur besseren Stabilisierung mit Kohle bedampft worden waren. Die Kontrastierung erfolgte nach der Methode von Reynolds (1963) mit Uranylacetat und Bleicitrat. Zur Durchmusterung der Präparate stand ein Elektronenmikroskop der Firma Siemens (Elmiskop I) zur Verfügung. Die Schnitte wurden hauptsächlich bei einer Beschleunigungsspannung von 80 000 kV ausgewertet. Die photographischen Arbeiten wurden im hauseigenen Labor ausgeführt.

4 . V e r s u c h e u n d E r g e b n i s s e

4.1. V e r m e h r u n g d e s a t t e n u i e r t e n H ü h n e r p o c k e n v i r u s i n H E F - Z e l l k u l t u r e n

Zellkulturen aus Hühnerembryofibroblasten sind als homologe embryonale Zellen das optimal empfängliche Zellsystem für die Vermehrung von Hühnerpocken-(HP)-Virus.

Dies gilt auch für das attenuierte HP-Virus, obwohl es für Huhn und Küken avirulent ist und keine Erkrankungen mehr hervorruft. Wie bei den anderen Pockeninfektionen in permissiven Wirtssystemen kann man auch bei dem vorliegenden Virus-Zell-System davon ausgehen, daß infizierte Hühnerembryofibroblasten im Durchschnitt etwa einhundert bis höchstens eintausend reife und infektionstüchtige Nachkommenviren pro Zelle synthetisieren.

Die Vermehrungsverhältnisse des HP-441-Virus in HEF-Zellen bilden die Basis für Vergleiche mit dem Verhalten dieses Virus in heterologen Zellkulturen sowie über sein Verhalten in inaktiviertem Zustand gegenüber Kulturzellen. Der Normalablauf der Vermehrung von HP-441-Viren in HEF-Zellkulturen wurde aus diesem Grunde im ersten Versuchsabschnitt als Vergleichsbasis virologisch und ultrahistologisch festgehalten.

4.1.1. Verlauf der Virusvermehrung

Nach einer massiven Infektion einer HEF-Kultur mit HP-441-Virus lief eine exponentielle Vermehrung des Virus ab, die innerhalb von drei bis vier Tagen zur vollständigen Zerstörung der Zellkultur führte.

In den eigenen Kontrollversuchen wurden dichtgewachsene HEF-Kulturen in Vierkantflaschen nach Breed-Demeter mit einer konzentrierten HP-441-Virussuspension beimpft und nach zwei Stunden Inkubation das Animpfvirus gründlich wieder entfernt. Vier Tage lang wurden die infizierten Kulturen in der Folgezeit mikroskopisch beobachtet, sowie in regelmäßigen Abständen Proben der Medium- und der Zellphase daraus zur Ermittlung des Virusgehaltes entnommen.

Erste zytopathische Zellveränderungen ließen sich nach etwa 25 bis 30 Stunden als schollige Veränderungen von Zellgruppen mit körnigem Zytoplasma erkennen. Die Abkugelungsphase setzte etwa 36 Stunden p. inf. ein. Sie verbreitete sich dann rasch auf den Großteil der Kulturzellen. Die Lysis der Zellen zeichnete sich nach etwa 48 Stunden ab und verstärkte sich bis zur 96. Stunde nach der Infektion bis zur fast vollständigen Zerstörung des Zellrasens.

Die in regelmäßigen Zeitabständen entnommenen Kulturproben wurden auf Virusgehalt titriert und aus den ermittelten Werten eine Vermehrungskurve, getrennt nach Medium- und Zellphase, erstellt. Sie ist in der Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Bei einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen pro Kultur und einer Animpfdosis von insgesamt $10^{7,5}$ bis 10^8 KID₅₀ errechnet sich ein Infektionsverhältnis von etwa 10 HP-Einheiten pro Zelle. Die Vermehrungskurve in Abbildung 1 kann somit im Sinne einer Einschnittvermehrung interpretiert werden.

Es wird ersichtlich, daß im Zeitraum von zwei bis sechs Stunden nach der Infektion der wesentliche Teil des infizierenden Virus zellulär gebunden und noch in infektiöser Form nachweisbar war. Nur ein Bruchteil des infizierenden Virus wurde nach der Adsorption von Zellen nicht aufgenommen und blieb gelöst (Titer im Kulturmedium). Die Virusvermehrung in den Zellen nahm nach einem Tag rasch zu; Nach zwei Tagen war die Synthese infektionstüchtiger Viruspartikel fast abgeschlossen. Mit der Reifung des HP-Virus in den Zellen stieg auch der Gehalt an extrazellulärem Virus in der Kultur an. Es bestätigte sich auch hier, daß, wie bei Pockeninfektionen bekannt, zumindest in der Vermehrungsphase nur etwa 10 % des Nachkommenvirus

aus der Zelle eluiert werden und der Rest zellgebunden bleibt. Die Werte in der Abbildung 1 sind die Mittelwerte aus zwei Versuchsreihen. Die gesamte Virusausbeute pro Kultur von rund 10^9 infektionstüchtigen Nachkommenviren wurde von maximal 5×10^6 Kulturzellen produziert. Dies entspricht einer Vermehrungsrate von mindestens 200 infektionstüchtigen Nachkommenviren pro Zelle.

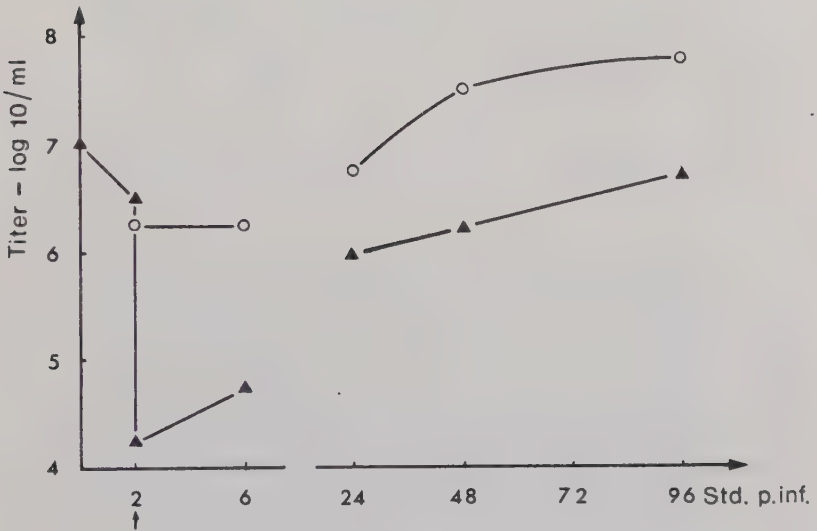


Abb. 1: Vermehrung des HP-441-Virus in HEF-Zellkulturen;
-○-zellgebundenes Virus, -▲- freies Virus,
↑ Mediumwechsel.

4.1.2.Virologisch - ultrahistologische Befunde

In Ultradünnschnitten von mit HP-441-Virus infizierten HEF-Zellen, angefertigt nach der zweistündigen Adsorptionsphase, konnten noch häufig an den Zellmembranen gebundene, im Schnitt noch intakt erscheinende Viruspartikel gefunden werden (Abbildung 2 und 3). Gewisse Veränderungen der normalen Teilchenstruktur waren jedoch vereinzelt schon zu beobachten. Solche Partikel schienen aufgequollen. Viele Zellen hatten Plasmaausläufer gebildet, welche Pockenpartikel teilweise oder ganz umschlossen. Auf diese Weise formierte Vakuolen mit Viruspartikeln waren im Zytoplasma öfter zu beobachten. Die Zeichnung der äußeren Virushülle solcher in Endozytose befindlicher Viren und der Vakuolenmembran erschien dann meist mehr diffus. Auch die scharfe Konturierung der Innenstruktur, wie sie sich bei vollständig intakten Viruspartikeln im Dünnschnitt darstellen läßt, fehlte in der Regel. Dies ist als erstes Anzeichen für den beginnenden "Uncoating-Prozeß" zu interpretieren.

16 Stunden p. inf. tauchten in den dann angefertigten Ultradünnschnitten vereinzelt Viroplasmazonen mit typischen Virusmembranstrukturen auf. Abbildung 4 und 5 zeigen eine solche "Virusfabrik". Neben sphärischen Bruchstücken traten vollständig geschlossene Virus-

hüllen auf. Während bei den meisten der Inhalt homogen und unstrukturiert erschien, lagen auch Vorstadien vor, die elektronenoptisch dunkle Kerne enthielten. Zum Teil waren diese Innenkörper von einem hellen Hof umgeben. Abbildung 5 stellt eine Viroplasmazone 48 Stunden p. inf. dar. Deutlich kann man darin Pockenvirus-Frühformen in verschiedenen Entwicklungsstadien unterscheiden. Daneben treten reife Elementarkörperchen in zum Teil dichter Lagerung auf.

Die Virusmatrix war unterschiedlich ausgebildet. Man erkennt lockere filamentöse Strukturen, längs- und querschnitten und dunkle, kompakte, homogene Zonen. Letztere ähneln nach ihrem elektronenoptischen Erscheinungsbild dem Heterochromatin der Kerne. Sie enthielten keine viralen Hüllen oder gar reife Viruspartikel, waren aber stets in enger Nachbarschaft zu Virusvorstufen und reifen Formen lokalisiert.

Ausgereifte Pockenpartikel ließen sich überwiegend in relativer Nähe zur Zytoplasmamembran bei noch intakt erscheinenden Zellen erkennen.

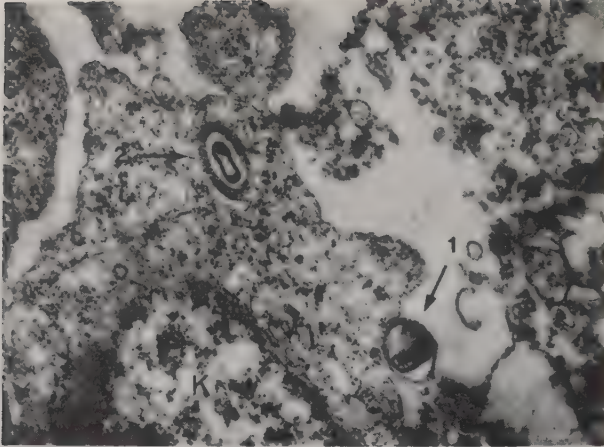


Abb. 2: Ultradünnschnitt durch eine HEF-Zelle, 2 Stunden p. inf.;
Gesamtvergr.: 1 : 40000
1 - Stadium der Adsorption
2 - Virus-Endozytose, Beginn der Lysisprozesse (Uncoating)
K = Zellkern

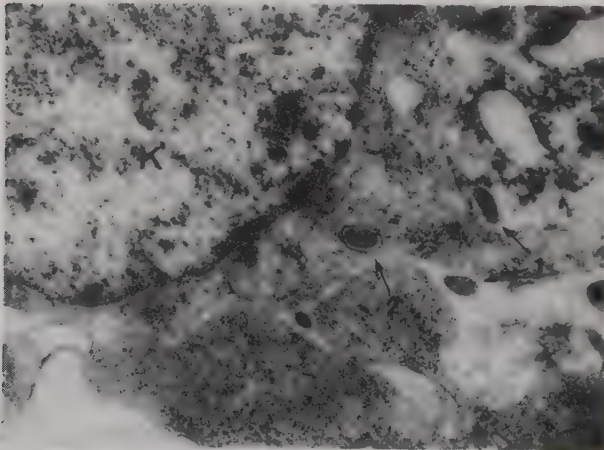


Abb. 3: wie Abb. 2;
Gesamtvergr.: 1 : 20000

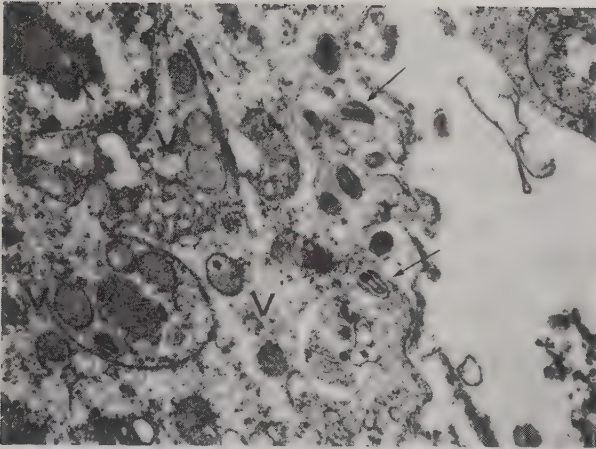


Abb. 4: Ultradünnschnitt durch eine HEF-Zelle, 19 Stunden p. inf.;
Gesamtvergr.: 1 : 20000
Viroplasmazone mit Pockenvirus-Vorstufen (V).
In der Nähe der Zytoplasmamembran sieht man gereifte
Virionen (Pfeile).
K= Zellkern

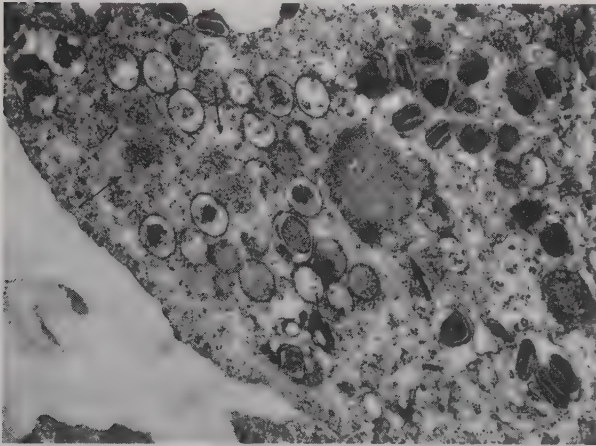


Abb. 5: wie Abb. 4, 45 Stunden p. inf.;
Gesamtvergr.: 1 : 22000
Große Viroplasmazone mit Virusvorstufen (vorwiegend links) und
reifen Virionen (rechts), längs- und quergeschnittene fibrilläre
Matrix (dünnen Pfeile) sowie dem Heterochromatin der Kerne
ähnliche Matrix (dicker Pfeil).

4.2. Verhalten des HP-441-Virus in ERN-Zellkulturen

Inwieweit attenuiertes HP-Virus auch an heterologen Zellen von unter natürlichen Verhältnissen nicht für das HP-Virus empfänglichen Wirtsspezies haftet, ob es wie sonst per Endozytose aufgenommen wird, eine Synthese von Nachkommenvirus beginnt und eventuell sogar eine Bildung reifer Nachkommenviren zustande kommt, war ein Hauptteil der Fragestellung dieser Arbeit. Als Modell wurden für diese Untersuchungen ERN-Zellen herangezogen. Im allgemeinen war anzunehmen, daß sich die Zellen dieses heterologen Systems nicht oder nur bedingt permissiv für ein Geflügelpockenvirus erweisen. Die Versuchsanordnung für die Untersuchungen in diesem Virus-Zell-System war die gleiche, wie in dem vorangegangenen unter 4.1. beschriebenen Kontrollversuchen.

4.2.1. Biologische Kontrollversuche über den Infektionsverlauf

Dichtgewachsene ERN-Zellkulturen in Vierkantflaschen nach Breed - Demeter mit einer Gesamtzellzahl von etwa 5×10^6 wurden mit insgesamt $10^{7,25}$ KID₅₀ des HP-441-Virus infiziert. Dies entspricht wiederum einer Virus-Zell-Relation von etwa 10 : 1. Nach zwei Stunden Adsorption wurde das Animpfvirus gründlich entfernt, das Kulturmedium gewechselt. Die Kultur wurde fortlaufend mikroskopisch kontrol-

liert, in bestimmten Abständen Proben der Medium- und der Zellphase gewonnen und diese auf Virusgehalt titriert.

48 Stunden p. inf. ließen sich mikroskopisch erste zytopathische Zellveränderungen in Form von abgekugelten Zellen und geringgradiger Lysis, erkennbar als diffuse Lückenbildung zwischen den Zellen, feststellen. Dieser Effekt verstärkte sich bis zum dritten Tag p. inf. Bei Abbruch des Versuches am vierten Tag waren nur mehr etwa 20 % der Kulturzellen intakt. Netzförmig hatte sich Zelllysis ausgebreitet und abgekugelte sowie aggregierte Zellen häuften sich an.

Die Ergebnisse der virologischen Probenuntersuchungen sind in der Abbildung 6 schematisch dargestellt. Nach zwei Stunden fiel der Virusgehalt im Kulturmedium signifikant ab, ein Großteil des infizierenden Virus war zellgebunden nachweisbar. Interessant war, daß der Gehalt an infektiösem Virus in der Zellphase bis zum vierten Tag p. inf. - als die Zahl der zytopathisch veränderten Zellen stark zugenommen hatte - in etwa konstant blieb. Die Mediumphase enthielt vom ersten bis vierten Tag p. inf. wiederum etwa 10 bis 20 % des nachweisbaren Gesamtvirus als zellfreies Virus. In dieser Zeitspanne ließen sich somit konstant insgesamt etwa 10 Millionen infektiöse HP-441-Partikel laufend nachweisen bei leichtem Rückgang

am vierten Tag p. inf. Zieht man die Zahl der jeweils noch intakten Kulturzellen in Betracht, dann müßte theoretisch bis zum zweiten Tag p. inf. eine ERN-Zelle im Durchschnitt etwa 1 bis 3, später sogar bis zu 10 Infektionstüchtige Nachkommenviren synthetisiert haben. Ein konstanter Virusgehalt in der Kultur bis vier Tage p. inf. ist nur so interpretierbar.

Festzuhalten ist ferner, daß trotz einer nur relativ schwachen Virusvermehrung ein zellzerstörender Effekt größeren Umfangs resultierte.

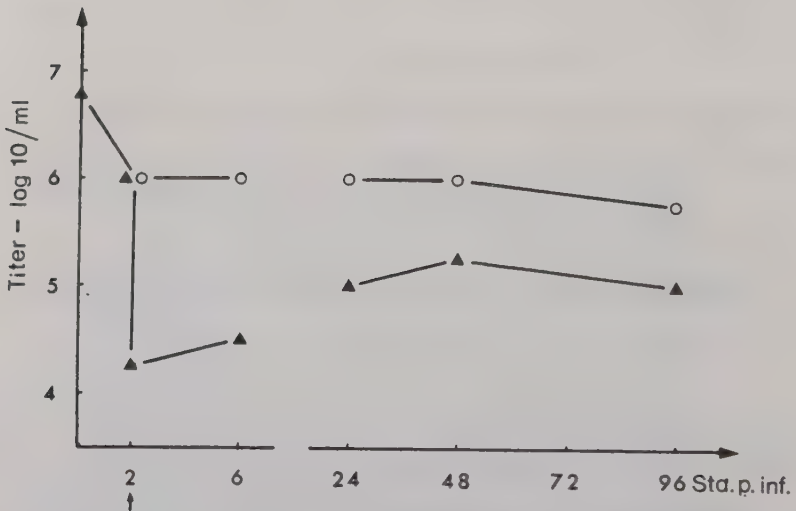


Abb. 6: Virusstatus in ERN-Zellkulturen, infiziert mit HP-441-Virus;
-○- zellgebundenes Virus, -▲- freies Virus,
(†) Mediumwechsel.

4.2.2. Ultrahistologische Befunde

In Ultradünnschnitten infizierter ERN-Zellen, angefertigt bis zu 18 Stunden p. inf., konnte HP-441-Virus in der Phase der Adsorption und der Penetration (Endozytose) in die Zellen festgehalten werden (Abbildungen 7 bis 11).

24 Stunden nach der Infektion wurden in entsprechenden Dünnschnitten auch in einigen Zellen kleine Zytoplasma-bezirke mit den typischen Frühformen der Pockensynthese entdeckt (Abbildung 12 bis 15), ja sogar kleine viroplasma-ähnliche Zonen. Eigenartigerweise konnten solche Frühformen stets aber nur als "leere" Hüllen, vereinzelt sogar im Kern infizierter Zellen, nachgewiesen werden (Abbildungen 14 bis 16).

Erst nach Durchmusterung vieler Dünnschnitte von diversen Proben jedoch gelang es auch, einige wenige, dann nur vereinzelt liegende reife Pockenpartikel elektronenoptisch zu finden (Abbildung 16).

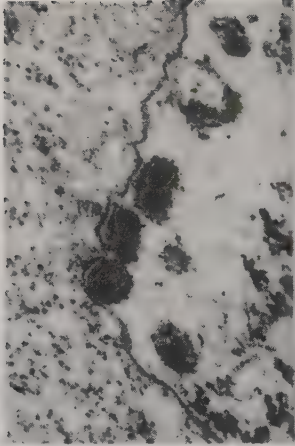


Abb. 7: Ultradünnschnitt durch eine ERN-Zelle, 3 Stunden p. inf.; Gesamtvergr.: 1 : 28000
Virusadsorption an die Zellmembran.



Abb. 8: wie Abb. 7;
Gesamtvergr.: 1 : 14000
Virus im Stadium der Adsorption (1) und Beginn einer Endozytose (2).

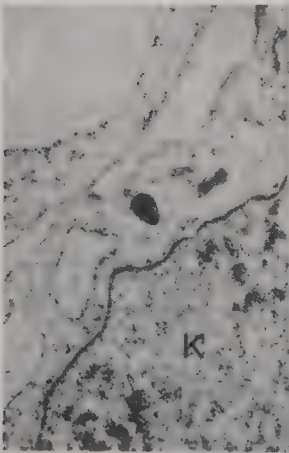


Abb. 9: wie Abb. 8;
Gesamtvergr.: 1 : 20000
Zytosevakuole mit Virionen im Zytoplasma.
K = Kern

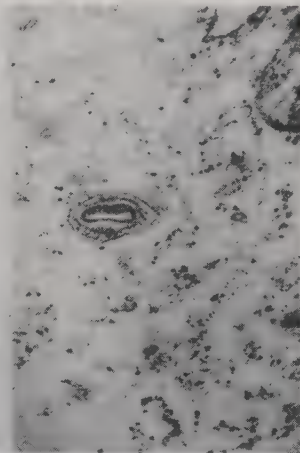


Abb. 10.: wie Abb. 9, 18 Stunden p. inf. ;
Gesamtvergr.: 1 : 35000
Uncoating des Virus im Zytoplasma, Vakuolenmembran noch erkennbar.

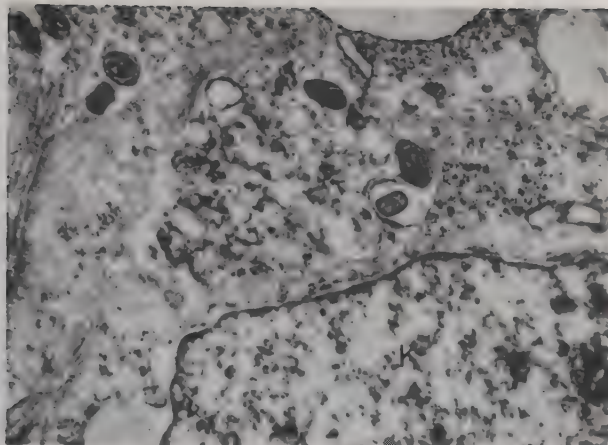


Abb. 11: wie Abb. 9, 4 Stunden pi inf.;
Gesamtvergr.: 1 : 25000
Mehrere Virionen in einer größeren Zytosevakuole im Zytoplasma.
K = Zellkern

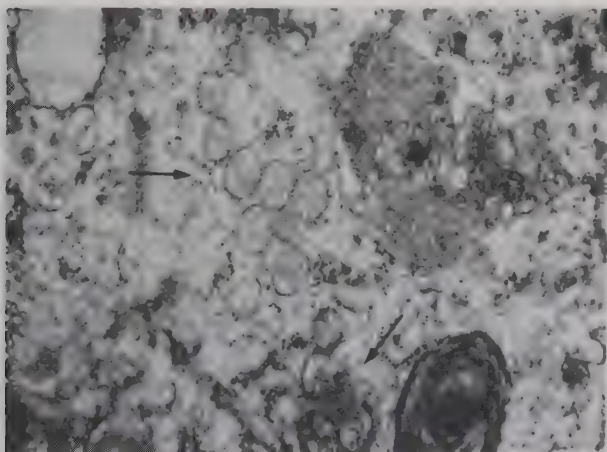


Abb. 12: Ultradünnschnitt durch eine ERN-Zelle, 24 Stunden p. inf.;
Gesamtvergr.: 1 : 25000
Virusvorstufen und Viroplasma (Pfeile).

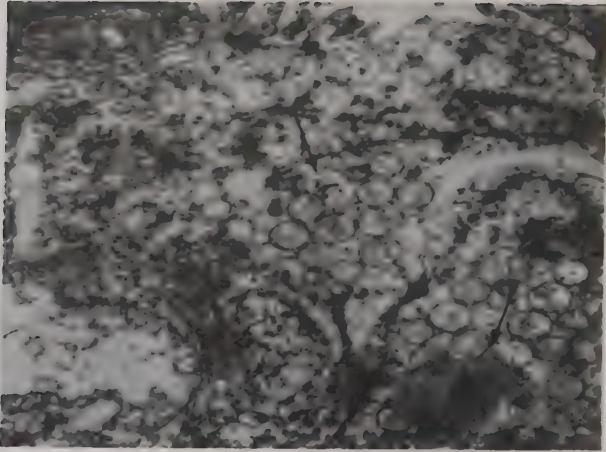


Abb. 13: wie Abb. 12;
Gesamtvergr.: 1 : 20000

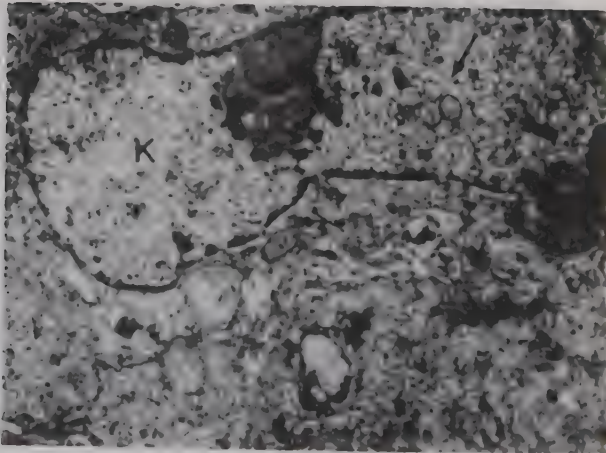


Abb. 14: wie Abb. 12;
Gesamtvergr.: 1 : 14000
Wenige Virusvorstufen im Zellkern (K, Pfeil).

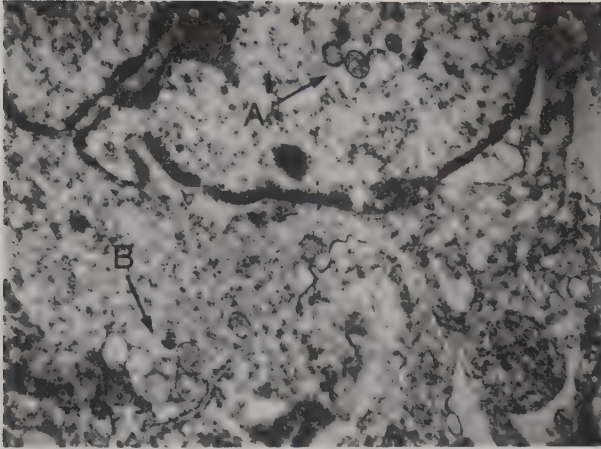


Abb. 15: wie Abb. 12;
Gesamtvergr. 1 : 14000
Virusvorstufen im Zellkern (A) und im Zytoplasma (B).

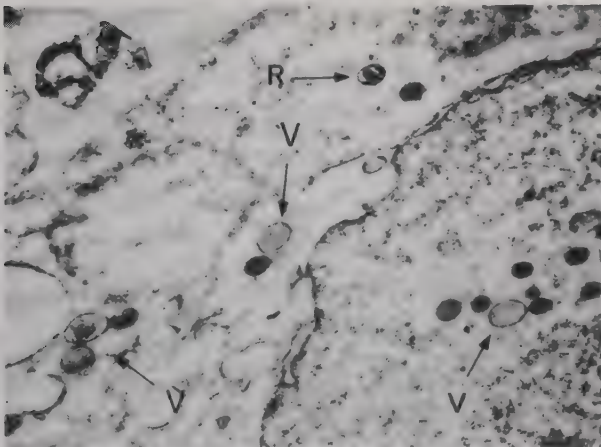


Abb. 16: Ultradünnschnitt durch eine ERN-Zelle, 94 Stunden p. inf. ;
Gesamtvergr.: 1 : 16000
Wenige Virusvorstufen (V) in Zytoplasma und Zellkern, ein
reifes Virion frei im Zytoplasma (R).

4.3. Ultrahistologische Befunde zur Reaktion von Kultur- zellen auf strahleninaktiviertes HP-441-Virus

Dicht gewachsene HEF-Kulturen einerseits und ERN-Kulturen andererseits wurden mit je 10 ml einer Suspension von strahleninaktiviertem HP-441-Virus beschickt. Der Virusgehalt betrug vor der Inaktivierung über 10^7 KID₅₀ pro ml. Nach zwei Stunden Adsorption wurde das Animpfmaterial wieder entfernt und ein Mediumwechsel vorgenommen.

Beide Arten von Zellkulturen, die homologen HEF- sowie die heterologen ERN-Zellen, zeigten im anschließenden Beobachtungszeitraum bis zum vierten Tag keinerlei zytopathische Zellveränderungen gegenüber nicht behandelten Kontrollen bei der lichtmikroskopischen Beobachtung.

In Ultradünnschnitten der mit inaktivierten Viren beschickten HEF-Kulturzellen wurden Viruspartikel nur am ersten Tag nach der Behandlung aufgefunden. Sie lagen vereinzelt in intraplasmatischen Räumen, meist adsorbiert an Zellmembranen, oder fanden sich bereits in Zytosevakuolen (Abbildungen 17 bis 19).

In nach 15 Stunden angefertigten Dünnschnitten ließen sich in einigen wenigen Fällen auch offensichtlich im Abbau befindliche Einzelpartikel erkennen (Abbildung 20).

Ein fast gleiches Bild boten die mit inaktivierten HP-441-Virus behandelten ERN-Zellen. Sehr selten und immer

nur vereinzelt waren Partikel in der Phase der Adsorption oder Penetration auszumachen (Abbildungen 21 und 22), wobei auch deutlich die morphologischen Hinweise für einen Virusabbau beobachtet werden konnten (Abbildungen 23 bis 25).

Zellveränderungen, die auf eine Virussyntese hindeuteten, wurden in den zwei Kulturzellarten 24 Stunden nach Virusinokulation und später nicht beobachtet.

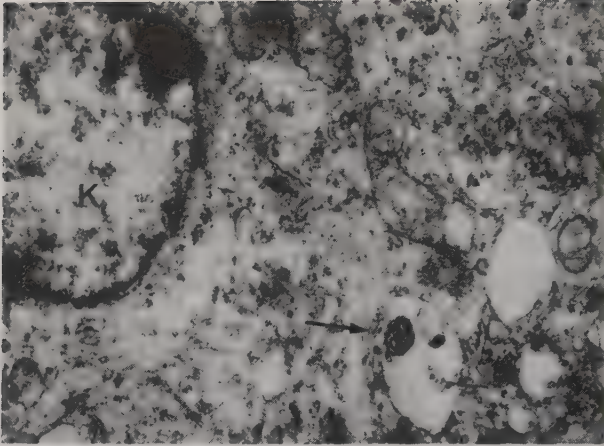


Abb. 17: Ultradünnschnitt durch eine HEF-Zelle, 8 Stunden nach der Adsorption von inaktiviertem HP - 441 - Virus;
Gesamtvergr.: 1 : 20000
Virion mit offensichtlich bereits defekter äußerer Doppelmembran (Pfeil) in einer Vakuole.
K = Zellkern

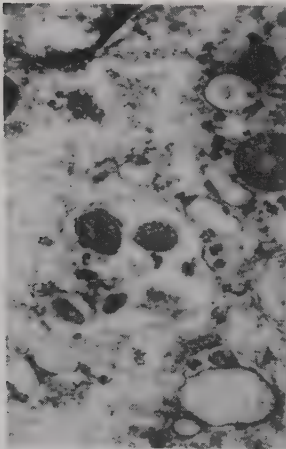


Abb. 18: wie Abb. 17;
Gesamtvergr.: 1 : 28000
Virion in Zytosevakuole.

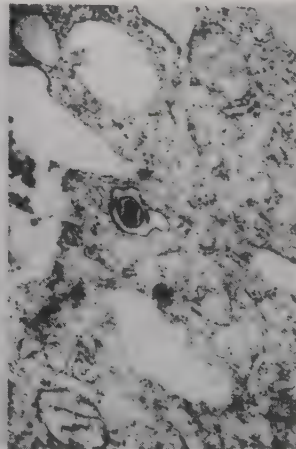


Abb. 19: wie Abb. 18;
Gesamtvergr.: 1 : 15000

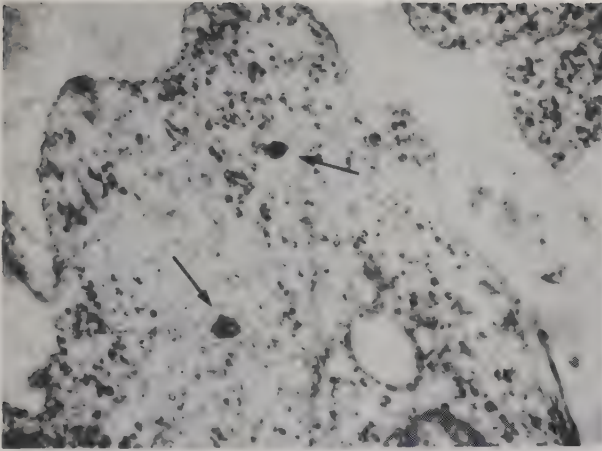


Abb. 20: wie Abb. 17, 15 Stunden nach Adsorption;
Gesamtvergr.: 1 : 14000
Abbau (Uncoating) eines Virion in einer Zytosevakuole.

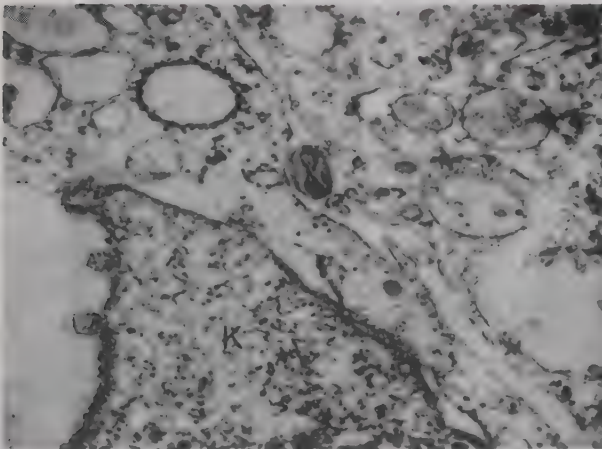


Abb. 21: Ultradünnschnitt durch eine ERN-Zelle, 2 Stunden nach Adsorption von inaktivem HP-441-Virus.
Gesamtvergr.: 1 : 28000
Virion in der Adsorptionsphase;
K = Zellkern



Abb. 22: wie Abb. 21;
Gesamtvergr.: 1 : 15000
Virion in Zytosevakuole.

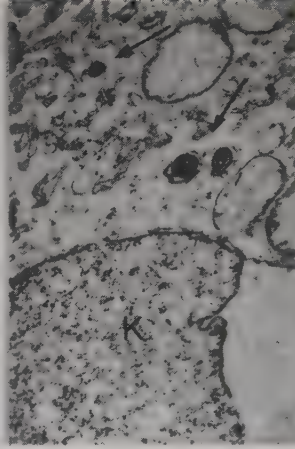


Abb. 23: wie Abb. 22;
Gesamtvergr.: 1 : 11000
Beginnender Abbau endo-
zytierter Virionen.

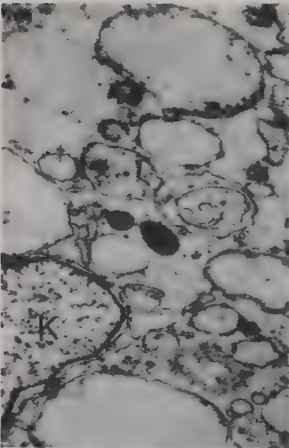


Abb. 24: wie Abb. 21, 5 Stunden
nach Adsorption.
Gesamtvergr.: 1 : 20000
Endozytiertes Virion mit
bereits verschwommener
Struktur und nicht mehr
vorhandener Vakuolenmem-
bran.

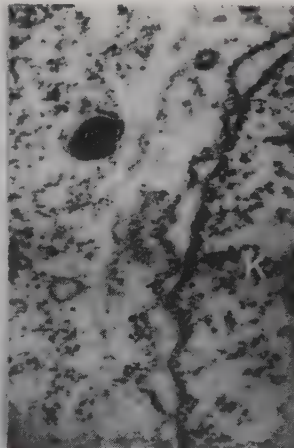


Abb. 25: wie Abb. 24;
Gesamtvergr.: 1 : 23000
Virion im Abbau (Un-
coating), Vakuolenmem-
bran noch angedeutet.

5. Besprechung der Ergebnisse

Die virologischen wie auch ultrahistologischen Ergebnisse aus dem zum Vergleich vorangestellten Untersuchungen über die Vermehrung des attenuierten HP-441-Virus in optimal empfänglichen HEF-Zellen bestätigen die Befunde, die für das Hühnerpockenvirus und andere Pockenviruspezies der Säuger vorliegen. Das HP-441-Virus wird rasch von HEF-Zellen per Endozytose aufgenommen und abgebaut, wie es z. B. für das Vacciniavirus exakt dargestellt wurde (Dales, 1963; Dales und Kajioaka, 1964). Daran schließt sich eine intensive zelluläre Synthese von Nachkommenviren über Virusvorstufen und deren Reifung zu kompletten Virionen in ausgeprägten, rein intraplasmatisch lokalisierten Viroplasmazonen an. Die Beteiligung des Zellkerns bei der Virussynthese, vor allem mit ultrahistologisch erkennbaren virusspezifischen Strukturen, ist noch umstritten, morphologische Kernveränderungen sind vereinzelt beschrieben (Pospischil und Bachmann, 1980). In Zellkulturen endet die Virusvermehrung mit zytopathischen Veränderungen und Zellzerstörung. Auch beim HP-441-Virus werden dabei pro infizierte Zelle mehr als 100 infektionstüchtige Nachkommenviren gebildet, von denen wiederum, übereinstimmend mit den Verhältnissen bei allen anderen untersuchten Pockenvirusarten, der überwiegende

Teil zellgebunden bleibt (Fenner et al., 1974).

Kein überraschendes aber ein interessantes Ergebnis resultiert aus den Versuchen, die mit dem aktiven und strahleninaktivierten attenuierten HP-441-Virus in embryonalen Rinder-nierenzellen und permissiven HEF-Zellen durchgeführt wurden.

Die ERN-Zellen erwiesen sich als zumindest partiell permissiv für das HP-441-Virus. Es penetrierte nicht nur in diese heterologen Zellen und wurde abgebaut wie in HEF-Zellen, sondern es lief auch eine geringgradige, fast abortiv zu nennende Virusreproduktion ab. Bereits 24 Stunden p. inf. konnten in infizierten ERN-Zellen vereinzelt Virusvorstufen nachgewiesen werden. Diese fanden sich in begrenzten intraplasmatischen Synthesezentren, die im Vergleich zu denen bei infizierten HEF-Zellen viel kleiner und lockerer strukturiert waren. Auch in der Spätphase konnten fast ausschließlich nur "leere" Virushüllen oder nur wenige ausgereifte Virusvorstufen beobachtet werden, neben den als pockenspezifisch beschriebenen filamentösen und tubulären Strukturen der Virusbildungszone. Auffallenderweise fanden sich vereinzelt und in sehr geringer Zahl Virusvorstufen als "leere" Virushüllen auch im Kern infizierter Zellen. Zwar kann man aufgrund bisheriger virologischer, biochemischer, histologischer (Einschlüsse),

fluoreszenzserologischer und auch ultrahistologischer Untersuchungen (Arhelger und Randall, 1964; Jefferts und Holowczak, 1971; Schestoschenko und Karev, 1973; Gaffort und Randall, 1976; Pospischil und Bachmann, 1980) eine Kernbeteiligung bei den Synthesevorgängen nicht ausschließen, doch wurden als morphologisch sichtbare Zeichen dafür vornehmlich filamentöse und tubuläre Strukturen beschrieben. Soekawa et al. (1977) beobachteten, übereinstimmend mit den eigenen Befunden, das intranukleäre Auftreten von Virusmembranen und -vorstufen in mit Kuh- und Affenpockenviren infizierten heterologen Schweinehautzellen. Aufgrund dieser und anderer zellmorphologischer Veränderungen schließen die Autoren auf ein abweichendes Verhalten dieser Viren, im Vergleich zur normalen zellulären Reproduktion der Pockenviren, in ihrem Modell mit heterologen Zellsystemen. Es gelang ihnen aber nicht, die Bildung von reifen Nachkommenviren zu erfassen. In diesem Zusammenhang sei eine Studie von Mahnel (1965) erwähnt, der unter anderem mit virulentem Hühnerpockenvirus Zellkulturen aus Kälbernieren infizierte und eine "zytotoxische" Zellzerstörung beschrieb. Eine echte Virusvermehrung verneinte der Autor und interpretierte die Befunde als nicht produktive "abortive" Infektion in diesem heterologen Virus-Zellsystem.

Demgegenüber erlauben die eigenen virologischen wie auch ultrahistologischen Ergebnisse den Schluß, daß sich das

vermehrungsfähige Hühnerpockenvirus in den heterologen, unter natürlichen Verhältnissen nicht permissiven (embryonalen) bovinen Zellen echt, wenn auch nur wenig produktiv und unter Bildung nur einzelner infektionstüchtiger Nachkommenviren pro Zelle vermehren konnte. Durch die zellulären virusspezifischen Prozesse wird auch der fortschreitende zytopathische Effekt, wie er sich mikroskopisch an den infizierten Zellkulturen verfolgen ließ, erklärbar.

Strahleninaktiviertes, überwiegend in seiner Nukleinsäure geschädigtes, attenuiertes HP-441-Virus, das nachweisbar seine Vermehrungsfähigkeit verloren hatte, induzierte auch bei hoher Dosierung keine mikroskopisch erkennbare Effekte, sowohl in den homologen HEF- als auch den heterologen ERN-Kulturen. Ultrahistologisch ließ sich an den Zellen beider Systeme verfolgen, daß das inaktivierte Virus in gleicher Weise wie vermehrungsfähiges Pockenvirus per Endozytose in die Zelle aufgenommen und abgebaut wird. Im zeitlichen Ablauf erschienen die Prozesse von Penetration und Uncoating in heterologen Zellkulturen jedoch verlangsamt. Noch nach 24 Stunden ließen sich Spuren von penetriertem Virus intraplasmatisch erkennen. Später wurden virusspezifische oder andere zellmorphologische Veränderungen nicht mehr beobachtet.

Diese eigenen Befunde stehen im Einklang mit den von

ultraviolett inaktiviertem Vacciniavirus bekannten Beobachtungen von Kajioka et al. (1964) und den Erkenntnissen aus den Versuchen von Joklik (1964).

Insgesamt fanden bisherige Theorien über die Aufnahme der intrazellulär relativ autonom agierenden Pockenviren in Zellen durch die eigenen ultrahistologischen Befunde eine fundierte Bestätigung. Vermehrungsfähiges wie auch schonend inaktiviertes, attenuiertes Hühnerpockenvirus kann in homologe wie heterologe Zellen passiv eindringen und damit zumindest intrazellulär eine Art Wechselbeziehung aufbauen oder Reaktionen initiieren. Auch wenn keine Prozesse der Virusreproduktion ausgelöst werden, scheinen damit virale Aktivitäten, wie sie aufgrund andersartiger Untersuchungen ebenfalls anzunehmen sind (Joklik, 1964; Decker et al., 1969) viele Stunden lang zu persistieren. Dies dürfte sicherlich nicht nur für epitheliale und endotheliale Zellen gelten, sondern vielleicht sogar in noch größerem Umfang für die zytosefreudigen Zellen des Resistenz- und Immunsystems eines Organismus. Die Untersuchungsergebnisse von Schestoschenko und Karev (1973) untermauern diese Annahme.

6. Zusammenfassung

Die Wechselbeziehungen zwischen einem attenuierten Hühnerpockenvirus, vorliegend in vermehrungsfähiger wie auch gammastrahleninaktivierter Form und homologen Hühnerembryofibroblasten sowie heterologen, embryonalen Rindernierenkulturzellen, wurde vergleichend ultrahistologisch untersucht.

Die Hühnerembryofibroblastenzellen reproduzierten das Hühnerpockenvirus nach dem für Pockenviren bekannten Muster komplett und in großer Menge. Bei den embryonalen Rindernierenzellen fand nach normaler Penetration und Uncoating des Virus ein offenbar verzögerter, überwiegend aber abortiver Vermehrungszyklus mit anschließender Reifung von nur sehr wenigen Nachkommenviren pro Zelle statt. Morphologisch dominierten in den infizierten Zellen die Frühstadien der Virusbildung, meist "leere" Virushüllen, die in verminderter Zahl und in nur kleinen Zentren intraplastisch auftraten, jedoch auch intranukleär beobachtet werden konnten. Reife Pockenpartikel waren kaum nachweisbar.

Mit Gammastrahlen inaktiviertes Hühnerpockenvirus wurde von den homologen wie heterologen Kulturzellen wie aktives Virus per Endozytose aufgenommen und allem Anschein nach auch vollkommen abgebaut. Morphologische Zellveränderungen ließen sich licht- und elektronenmikroskopisch nicht erkennen.

Summary

Ultrahistological studies on the reactions of homologous and heterologous culture cells with active and inactive avian poxvirus.

Comparative ultrahistological studies on the interaction of an attenuated fowlpox virus - which was available in a reproducible form as well as inactivated by gamma-rays - and homologous chick embryo fibroblast cells as well as heterologous embryonal kidney culture cells of cattle were performed.

According to the pattern of virus multiplication, the chick embryo fibroblast cells reproduced the fowlpox virus completely and in quantity, while for the embryonal kidney cells of cattle an obviously retarded but mainly abortive propagation took place with maturation of only a few progeny viruses per cell. This happened after normal penetration and uncoating of the virus. Morphologically dominated in the infected cells the early stages of virus formation, mainly as "empty" virus envelopes, which appeared in reduced quantity and only in small centres intraplasmatically. However, they could also be observed intranuclearly. Mature pox virus particles were scarcely detectable.

Gamma-ray inactivated fowlpox virus was adsorbed by homologous and heterologous cells like active virus by endocytosis and was apparently catabolized totally. Morphological cell changes were evidently not seen.

7. Literaturverzeichnis

- ABEL, P., (1962): Multiplicity reactivation and marker rescue with vaccinia virus.
Virology **17**: 511.
- ARHELGER, R.B., and C. C. RANDALL, (1964): Electron microscopic observation of the development of fowlpox virus in the chorioallantoic membrane.
Virology **22**: 59.
- BENYESH, M., E. C. POLLARD, E. M. OPTON, F. L. BLACK, W. D. BELLANG, and J. L. MELNICK, (1958): Size and structure of ECHO, poliomyelitis and measles virus determined by ionizing radiation and ultrafiltration.
Virology **5**: 256.
- BOLLINGER, O., (1873): Über Epithelioma contagiosum beim Haushuhn und die sogenannten Pocken des Geflügels.
Arch. Pathol. Anat. Physiol. **58**: 349.
- DALES, S., (1963): Uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral DNA.
J. Cell. Biol: **18**: 51.
- DALES, S., (1973): The structure and replication of poxviruses as exemplified by vaccinia.
In: "Ultrastructure of Animal Viruses and Bacteriophages: An Atlas". Seite 109 -132.
Herausgegeben von A. J. Dalton und F. Haguenau.
New York, London: Academic Press.

- DALES, S., and R. Kajioka, (1964): The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain L cells: I. Uptake and penetration.
Virology **24**: 278.
- DALES, S., and E. H. MOSBACH, (1968): Vaccinia as a model for membrane biogenesis.
Virology **35**: 564.
- DALES, S., W. STERN, S. B. WEINTRAUB, and T. HUIMA, (1976): Genetically controlled surface modifications by poxvirus influencing cell-cell and cell-virus interaction. In: "Cell Membrane Receptors for Viruses, Antigens and Antibodies, Polipeptid Hormons and Small Molecules."
Seite 253 -270, herausgegeben von Beers, R. F. und E. G. Basset, Raven Press, New York.
- DECKER, C., J. Guir, and A. Kirn, (1969): Infektivität und capacity for DNA replication of vaccinia virus irradiated by γ -rays.
J. gen. Virol. **4**: 221.
- FENNER, F., I. H. HOLMES, W. K. JOKLIK, and G. M. WOODROOF, (1959): Reactivation of heat inaktivated pox-viruses.
Nature **183**: 1340.
- FENNER, F., B. R. MCAUSLAN, C. A. MIMS, J. SAMBROOK, and D. O. WHITE, (1974): The Biology of Animal Viruses.
New York, London: Academic Press,

- FENNER, F., and G. M. WOODROOF, (1960): The reactivation of poxviruses: II. The range of reactivating viruses.
Virology **11**: 185.
- GAFFORD, L. G., and C. C. RANDALL, (1976): Virus-specific RNA and DNA in nuclei of cells infected with fowlpox viruses.
Virology **69**: 1.
- GAFFORD, L. G., F. SINCLAIRE, and C. C. RANDALL, (1969): Growth cycle of fowlpox virus and change in plaque morphology and cytopathology by contaminating mycoplasma.
Virology **37**: 469.
- GALASSO, G. J., and D. G. SHARP (1963): Homologous inhibition with heated and ultraviolet - treated vaccinia virus in cultures of L cells.
Virology **20**: 1.
- GALLASSO, G. J., and D. G. SHARP; (1963): Homologous inhibition, toxicity and multiplicity reactivation with ultraviolet - irradiated vaccinia virus.
J. Bact. **85**: 1309.
- HERZBERG, K. und A. KLEINSCHMIDT; (1959): Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Kanarienvogelpockenvirus.
Zbl. Bakt., Abt. I. Orig. **174**: 1.
- HEYDE, J. M., L. G. GAFFORD; and C. C. RANDALL, (1964): New informations concerning the fine structure of fowlpox virus.
J. Cell. Biol. **23**: 44.

- HEYDE, J. M., L. G. GAFFORD, and C. C. RANDALL, (1965):
Fine structure of the coat and nucleoid
material of fowlpox virus.
J. Bact. **89**: 1557.
- HEYDE, J. M., L. G. GAFFORD, and C. C. RANDALL, (1967):
Molecular weight determination of fowlpox
virus DNA by electron microscopy.
Virology **33**: 112.
- HEYDE, J. M., and D. PETERS, (1971): The organisation of
nucleoprotein within fowlpox virus.
J. Ultrastruct. Res. **35**: 626.
- HOLOWCZAK, J. A., (1972): Uncoating of poxviruses I.
Virology **50**: 216.
- ICHICHASHI, J., S. MATSUMOTO, and S. DALES, (1971):
Biogenesis of poxviruses: Role of A-type
inclusions and host cell membranes in virus
dissemination.
Virology **46**: 507.
- JEFFERTS, E. R., and J. A. HOLOWCZAK, (1971): RNA
synthesis in vaccinia-infected L cells:
Inhibition of ribosome formation and
maturation.
Virology **46**: 730.
- JOKLIK, W. K., (1962): Reaktivation of poxviruses:
Fate of reactivable virus within the cell.
Nature **196**: 556.

- JOKLIK, W. K., (1964): The intercellular fate of rabbit-pox virus rendered noninfectious by various reagents.
Virology **22**: 620.
- JOKLIK, W. K., (1966): The poxviruses.
Bact. Rev. **30**: 33.
- KAERBER, G., (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch. exp. Path. Pharmac. **162**: 480.
- KAJIOKA, R., J. SIMINOWITCH, and S. DALES, (1964): The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain L cells.
II. Initiation of DNA synthesis and morphogenesis.
Virology **24**: 295.
- KATES, J. R., and B. R., MCAUSLAN, (1967): Messenger RNA synthesized by a "coated" viral genom.
Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S.) **57**: 314.
- MAHNEL, H., (1965): Zytotoxische Wirkung von Pockenviren.
Zschr. Hyg. **151**: 185.
- MAYR, A., (1979): Erfahrungen mit dem Paramunitätsinducer PIND-AVI in der Tiermedizin.
collegium veterinarium **60**: 35.
- MAYR, A. und K. KALCHER, (1960): Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in Zellkulturen.
Arch. Virusforsch. **10**: 72.

- MAYR, A. und K. KALCHER, (1961): Plaque - Bildung bei Geflügelpockenviren.
Arch. Virusforsch. **11**: 304.
- MAYR, A. und H. MAHNEL, (1970): Charakterisierung eines vom Rhinoceros isolierten Hühnerpockenvirus.
Arch. Virusforsch. **31**: 51,
- MAYR, A. und K. MALICKI, (1966): Attenuierung von virulentem Hühnerpockenvirus in Zellkulturen und Eigenschaften des attenuierten Virus.
Zbl. Vet. Med. B. **13**: 1.
- MAYR, A., M. RATH und K. DANNER, (1971): Perorale Immunisierung gegen Pocken.
Zbl. Vet. Med. B **18**: 347.
- MAYR, A., W. RAETTIG, H. STICKL und M. ALEXANDER, (1979): Paramunität, Paramunisierung, Paramunitätsinducer.
Fortschr. Med. **97**: 1159.
- MCCLAIN, M. E., and M. GREENLAND, (1965): Recombination between rabbitpox virus mutants in permissive and nonpermissive cells.
Virology **25**: 516.
- MEDZON, E. L., and H. BAUER, (1970): Structural features of vaccinia virus revealed by negative staining, sectioning and freeze - etching.
Virology **40**: 860.

- METZ, D. H., M. ESTEBAN, and H. DANIELESCU, (1975):
The formation of virus polyribosomes in L
cells infected with vaccinia virus.
J. gen. Virol. **27**: 181.
- MORGAN, C., (1976 a): The insertion of DNA into
vaccinia virus.
Science **193**: 591.
- MORGAN, C., (1976 b): Vaccinia virus reexamined:
Development and release.
Virology **73**: 43.
- POSPISCHIL, A., and P. A. BACHMANN, (1980): Nuclear
changes in cells infected with parapox-
viruses stomatitis papulosa and orf:
An in vivo and in vitro ultrastructural study.
J. gen. Virol. **47**: 113.
- RANDALL, C. C., and L. G. GAFFORD, (1964): Composition
of fowlpox virus and inclusion matrix.
J. Bact. **87**: 939.
- REYNOLDS, E. S., (1963): The use of lead citrate at high
pH as an electron - opaque stain in electron
microscopy.
J. Cell Biol. **17**: 208.
- ROLLE, M. und A. MAYR, (1978): Mikrobiologie und Seuchen-
lehre, 4. Auflage
F. Enke Verlag Stuttgart.

- SCHESTOSCHENKO, M. A., and P. KAREV, (1973): Detection of poxvirus antigen in heterologous cell systems, particularly fowlpox virus. *Veterinaria* **11**: 49.
- SHARP, D. G., (1963): Total multiplicity in the animal virus-cell reaction and its determination by electron microscopy. *Ergebn. Mikrobiol.* **36**: 214.
- SMADEL, J. E., G. I. LAVIN, and R. I. DUBOS, (1939): Some constituents of elementary bodies of vaccinia virus. *J. exp. Med.* **71**: 373.
- SOEKAWA, M., R. MORIGUCHI, C. MORITA, T. KITAMURA, and J. TANAKA, (1977): Electron - microscopical observation on the development of vaccinia, cowpox and monkeypox virus in pig skin. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* **237**: 425.
- SPEARMAN, C., (1931): zitiert nach G. KAERBER.
- STERN, W., and S. DALES, (1974): Biogenesis of vaccinia: Concerning the origin of the envelope phospholipids. *Virology* **62**: 293.
- STETTMUND von BRODOROTTI, H., (1978): Vergleichende Untersuchungen über die Inaktivierung verschiedener Virusarten durch Gammastrahlen. *Vet. Med. Diss. München.*

- STOKES, G. V., (1976): High - voltage electron-microscopical study of the release of vaccinia virus from the whole cell.
J. gen. Virol. **18**: 636.
- THIELE, J., H. KIEL, and H. D. ADOLPHS, (1979): Avian pox virus: An ultrastructural study on a cherrug falcon.
Arch. Virol. **62** 77.
- KIM, U., V. MUKHAJONPAN, S. NII, and S. KATO, (1977): Ultrastructural study of cell cultures infected with swinepox and orf viruses.
Biken J. **20**: 57.
- WESTWOOD, J. C. N., W. J. HARRIS, H. T. ZWARTOUW, D. H. J. TITMUSS, and G. APPLEYARD, (1964): Studies on the structure of vaccinia virus.
J. gen. Microbiol. **34**: 67.

Herrn Prof. Dr. DDr. h. c. A. Mayr gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. H. Mahnel danke ich herzlichst für seine Unterstützung und jederzeit gern gewährten Hilfe.

Bei Frl. Dr. Stettmund von Brodorotti bedanke ich mich recht herzlich für Ihre Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Frau Preis für die Einführung in die Technik der Elektronenmikroskopie.

Lebenslauf

Am 13. Oktober 1955 wurde ich, Gottlieb Scherrer, als Sohn des Landwirts Gottlieb Scherrer und seiner Ehefrau Anna Scherrer, geb. Zeller, in Überlingen am Bodensee geboren.

Ich bin Schweizer Staatsbürger.

Von 1962 bis 1966 besuchte ich die Volksschule in Überlingen, anschließend die Realschule und wechselt dann auf das staatliche Gymnasium Überlingen, das ich 1974 nach dem Abitur verließ.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich in München mit dem Studium der Veterinärmedizin und legte am 6. September 1979 das Staatsexamen ab.

Die Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 16. Juni 1980.

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich am 15. September 1979 begonnen.

